

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年 9月29日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第276153号

出 願 人

Applicant (s):

松下電器産業株式会社



1999年 8月 2日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建

RECEIVED  
FEB 28 2000  
TC 1700 MAIL ROOM



出証番号 出証特平11-3054295

【書類名】 特許願

【整理番号】 2030100064

【提出日】 平成10年 9月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 27/30

【発明の名称】 グルコースセンサ

【請求項の数】 2

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 湯川 系子

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 吉岡 俊彦

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 南海 史朗

【発明者】

【住所又は居所】 香川県高松市古新町8番地の1 松下寿電子工業株式会社内

【氏名】 岩田 潤子

【発明者】

【住所又は居所】 香川県高松市古新町8番地の1 松下寿電子工業株式会社内

【氏名】 宮崎 正次

【発明者】

【住所又は居所】 香川県高松市古新町8番地の1 松下寿電子工業株式会

社内

【氏名】 馬場 英行

【特許出願人】

【識別番号】 000005821

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地

【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100062926

【弁理士】

【氏名又は名称】 東島 隆治

【選任した代理人】

【識別番号】 100072431

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 和郎

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 031691

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9301762

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 グルコースセンサ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 電気絶縁性の基板、前記基板上に設けられた少なくとも作用極と対極を有する電極系、および前記電極系に接してまたはその近傍に形成され、少なくともピロロキノリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼを含む反応層を具備し、前記反応層が、フタル酸、フタル酸の塩、マレイン酸、マレイン酸の塩、コハク酸、コハク酸の塩、トリエタノールアミン、トリエタノールアミンの塩、クエン酸、クエン酸の塩、ジメチルグルタル酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、トリス(ヒドロキシメチル)グリシン、トリス(ヒドロキシメチル)グリシンの塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンおよびトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの塩からなる群より選ばれる少なくとも1種の添加剤を含むことを特徴とするグルコースセンサ。

【請求項 2】 前記グルコースデヒドロゲナーゼが、前記添加剤によって被覆されている請求項 1 記載のグルコースセンサ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、試料中の特定成分について、迅速かつ高精度な定量を簡便に実施することができるグルコースセンサに関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などを行うことなく簡易に定量する方式として、様々なバイオセンサが提案されている。バイオセンサの一例として、次のようなセンサが知られている（特開平 2-062952 号公報）。

このバイオセンサは、絶縁性の基板上にスクリーン印刷等の方法で作用極、対極および参照極からなる電極系を形成し、この電極系上に接して親水性高分子と酸化還元酵素と電子受容体を含む酵素反応層を形成したものである。

このようにして作製したバイオセンサの酵素反応層上に基質を含む試料液を滴下すると、酵素反応層が溶解して酵素と基質が反応し、これに伴い電子受容体が還元される。酵素反応終了後、還元された電子受容体を電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求めることができる。

上記のようなバイオセンサは、測定対象物質を基質とする酵素を選択することによって、様々な物質に対する測定が原理的には可能である。

例えば、酵素にグルコースオキシダーゼを選択すると、試料液中のグルコース濃度を測定するグルコースセンサを作製することができる。

#### 【0003】

上記のような構成のバイオセンサでは、通常、酵素は、乾燥状態でセンサ内に保持されている。

酵素は、蛋白質を主成分とするため、空気中などの水分に長期間接すると、変性したり、極端な場合、失活したりする危険性がある。

そのため、センサを長期間保存すると、酵素の活性が低下して、基質と反応する酵素量が不足するようになり、得られる応答電流値が、基質の濃度に比例しなくなる場合がある。

また、通常、基質濃度が0の試料液をセンサ内に導入しても、ある程度のセンサ応答電流値（以下、ブランク値という。）が得られる。このブランク値が生じる原因の一つとして、センサ内に導入され、反応層を溶解した試料液に含まれるイオンが、基板上の電極表面に溜まり、電極反応を起こすことが考えられる。このブランク値が大きいと、応答電流値と基質の濃度との相関性が低下する要因となるため、基質の正確な定量ができなくなる。

#### 【0004】

したがって、保存安定性に優れ、ブランク値の小さいバイオセンサを得るためには、酵素の活性が長期間保持されるような環境を酵素の近傍に整えることが重要であり、かつブランク値が無視できる程度に小さくなるように基板上の電極表面の環境を与えることが重要である。また、酵素反応時に電子や基質の移動などを円滑に行い、センサの応答性を高めることも必要である。

上記のような課題を解決するため、従来、リン酸などの添加剤を反応層に含有

させていた。

【0005】

一方、高性能なグルコースセンサを作製するため、従来、酵素として、ピロロキノリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼ（以下、PQQ-GDHという。）を用いていた。PQQ-GDHは、それ自体の触媒反応に酸素が関与しないため、酵素反応が血中などの溶存酸素の影響を全く受けないという特性を持つ。そのため、この酵素を利用したグルコースセンサは、試料液中の酸素分圧によって測定値がばらつくことがなく、高性能なセンサとなる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、酵素として、PQQ-GDHを用いた場合、従来の添加剤を反応層に含有させても、ブランク値を小さくすることができず、また、保存安定性もよくなかった。

本発明は、上記課題に鑑み、保存安定性が高く、ブランク値が小さい高性能なグルコースセンサを提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明によるグルコースセンサは、電気絶縁性の基板、前記基板上に設けられた少なくとも作用極と対極を有する電極系、および前記電極系に接してまたはその近傍に形成され、少なくともピロロキノリンキノンを補酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼを含む反応層を具備し、前記反応層が、フタル酸、フタル酸の塩、マレイン酸、マレイン酸の塩、コハク酸、コハク酸の塩、トリエタノールアミン、トリエタノールアミンの塩、クエン酸、クエン酸の塩、ジメチルグルタル酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、トリス（ヒドロキシメチル）グリシン、トリス（ヒドロキシメチル）グリシンの塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンおよびトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンの塩からなる群より選ばれる少なくとも1種の添加剤を含むことを特徴とする。

ここにおいて、前記酵素が、前記添加剤によって被覆されていることが好ましい。

【0008】

【発明の実施の形態】

上記のように、本発明のグルコースセンサは、酵素としてPQQ-GDHを含む反応層にフタル酸等の添加剤を含ませたものである。

上記のような添加剤、例えばフタル酸水素カリウムとPQQ-GDHの混合溶液を滴下し乾燥して反応層を形成すると、酵素表面はフタル酸水素カリウムによって取り巻かれるため、温度、湿度、電荷の状態などの環境の変化から酵素を保護することができ、酵素の活性を長期間安定させることができる。

また、添加剤は、センサ内に試料液が導入されると溶解してイオン化し、試料液に含まれていたイオンや、反応層の溶解によって生じたイオンに影響を与える。その結果、基板上の電極表面にイオンが溜まらなくなり、ブランク値を小さくできる要因の一つとなる。

さらに、上記のような添加剤を反応層に含めると、反応層が水に容易に溶けるため、試料溶液を反応層に添加すると、反応層は直ちに溶解し、酵素反応と電極反応を円滑に進めることができ都合がよい。

【0009】

上記のような効果が期待できる添加剤には、フタル酸、フタル酸水素カリウムなどのフタル酸の塩、マレイン酸、マレイン酸ナトリウムなどのマレイン酸の塩、コハク酸、コハク酸ナトリウムなどのコハク酸の塩、トリエタノールアミン、トリエタノールアミン塩酸塩などのトリエタノールアミンの塩、クエン酸、クエン酸一カリウム、クエン酸カルシウム、クエン酸三カリウム、クエン酸三ナトリウム、クエン酸三リチウム、クエン酸水素二アンモニウム、クエン酸水素二ナトリウム、クエン酸ナトリウム、クエン酸二アンモニウム、クエン酸二水素カリウム、クエン酸二水素ナトリウム、クエン酸二ナトリウム、クエン酸マグネシウムなどのクエン酸の塩、ジメチルグルタル酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、トリス(ヒドロキシメチル)グリシン、トリス(ヒドロキシメチル)グリシンの塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩酸塩などのトリスの塩などが挙げられる。

特に、フタル酸水素カリウムを用いると、保存安定性および応答特性に優れ、

ブランク値の非常に小さいグルコースセンサを得ることができる。

【0010】

本発明の反応層には、酵素反応に伴って還元される電子受容体を含有させてもよい。この電子受容体には、フェリシアン化イオン、p-ベンゾキノンおよびその誘導体、フェナジンメトサルフェート、メチレンブルー、フェロセンおよびその誘導体等を用いることができる。

【0011】

本発明の反応層には、親水性高分子を含有させてもよい。反応層中に親水性高分子を添加することにより、電極系表面からの反応層剥離を防ぐことができる。さらに、親水性高分子は、反応層表面の割れを防ぐ効果も有しており、バイオセンサの信頼性を高めるのに効果的である。

このような親水性高分子としては、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリリジンなどのポリアミノ酸、ポリスチレンスルホン酸、ゼラチンおよびその誘導体、アクリル酸およびその塩の重合体、メタクリル酸およびその塩の重合体、スターチおよびその誘導体、無水マレイン酸およびその塩の重合体、アガロースゲルおよびその誘導体が好適に用いられる。

【0012】

バイオセンサ内における反応層の配置には、電気絶縁性の基板上に形成された電極系上に形成する以外にも種々の形態がある。例えば、前記基板の電極系上以外の場所や、前記基板に組み合わされて基板との間に前記電極系に試料液を供給する試料液供給路を形成するカバー部材を用い、このカバー部材の試料液供給路に露出する面に配置することができる。

酸化電流の測定方法としては、作用極と対極のみの二電極方式と、参照極を加えた三電極方式があり、三電極方式の方がより正確な測定が可能である。

【0013】

【実施例】



以下に、具体的な実施例を挙げて、本発明をより詳細に説明する。

図1は、本発明の一実施例におけるバイオセンサの反応層を取り除いた概略平面図である。ポリエチレンテレフタレートからなる電気絶縁性の基板1上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷し、リード2、3を形成している。次いで、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを基板1上に印刷して作用極4を形成している。この作用極4は、リード2と接触している。さらに、この基板1上に、絶縁性ペーストを印刷して絶縁層6を形成している。絶縁層6は、作用極4の外周部を覆っており、これにより作用極4の露出部分の面積を一定に保っている。そして、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストをリード3と接触するように基板1上に印刷してリング状の対極5を形成している。

#### 【0014】

図2は、図1のバイオセンサの縦断面図である。図1のようにして作製した電極系上に、親水性高分子層7が形成され、この親水性高分子層7の上にPQQ-GDHと添加剤を含む反応層8が形成されている。

#### 【0015】

##### 《実施例1》

図1の基板1の電極上に、親水性高分子であるカルボキシメチルセルロースのナトリウム塩（以下、CMCと略す。）の0.5wt%水溶液を滴下し、50℃の温風乾燥器中で10分間乾燥させ、CMC層7を形成した。続いて、PQQ-GDH 5000ユニットとフタル酸水素カリウム20μMおよびフェリシアン化カリウム50μMを水1mlに溶解した混合溶液をCMC層7上に滴下し乾燥して、反応層8を形成し、グルコースセンサを作製した。

#### 【0016】

試料液として、種々の濃度に調整したグルコース水溶液を用意した。そして、この調製した試料液を反応層8上に滴下した。グルコースを含む試料液が反応層に供給されると、試料内のグルコースはPQQ-GDHにより酸化される。そして、これと同時に反応層中のフェリシアン化カリウムがフェロシアン化カリウムに還元される。

試料液を滴下してから1分後に、対極5を基準にして作用極4に+0.5Vの

電圧を印加して、フェロシアン化カリウムを酸化した。そして、5秒後に対極と作用極の間を流れる電流値を測定した。

同様に、種々の濃度のグルコース水溶液に対する電流値を測定し、横軸にグルコース濃度、縦軸に電流値をプロットしてセンサの応答特性図を作成した。その結果を図3に示す。

また、同様に作製したバイオセンサを6ヶ月間保存した後、このバイオセンサの応答特性図を作成した。その結果を図3に示す。

図3より、得られたセンサは、ブランク値が非常に小さく、また、濃度と電流値との間には一定の相関性があり、優れた直線性を示した。

センサ作製直後と6ヶ月保存後のセンサの応答特性にはほとんど差はなく、得られたセンサの保存性は優れていた。

【0017】

#### 《比較例1》

フタル酸水素カリウムの代わりに、リン酸カリウムを添加した以外は、実施例1と同様にグルコースセンサを作製した。そして、実施例1と同様に、作製直後と6ヶ月間保存後のセンサの応答特性図を作成した。その結果を図3に示す。

このセンサは、図3より明らかなように、ブランク値が高く、グルコース濃度が110mg/dlよりも低濃度域では、グルコース濃度を反映した真の電流値よりも高い応答電流値を示した。逆に、グルコース濃度が110mg/dlよりも高濃度域になると、応答電流値は、実施例1よりも低くなり、グルコース濃度と電流値との直線性も低下した。

また、6ヶ月間保存後のセンサは、直線性が作製直後のセンサよりもさらに低下し、得られたセンサの保存性はよくなかった。

【0018】

#### 《比較例2》

フタル酸水素カリウムを加えなかった以外は、実施例1と同様にグルコースセンサを作製した。そして、実施例1と同様に、作製直後と6ヶ月間保存後のセンサの応答特性図を作成した。

その結果、得られたセンサのブランク値は、非常に大きく、また、基質濃度が増加しても、応答電流値はあまり増加しなかった。また、6ヶ月間保存後のセンサは、酵素が失活し、基質濃度が増加しても、応答電流値はほとんど増加しなかった。

【0019】

# 《実施例2》

電極上にCMC層7を形成しない以外は、実施例1と同様にしてグルコースセンサを作製した。そして、実施例1と同様にして、作製直後と6ヶ月間保存後のセンサの応答特性図を作成した。

その結果、グルコース濃度と電流値との間には、一定の相関性があり、良好な直線性を有していた。ブランク値も小さかった。また、センサ作製直後と6ヶ月保存後のセンサの応答特性にはほとんど差はなく、良好な保存性を示した。

【0020】

# 【発明の効果】

上記のように、本発明によれば、長期保存性の優れ、ブランク値の低い高性能なグルコースセンサを得ることができる。

# 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

本発明の一実施例におけるグルコースセンサの反応層を除いた概略平面図である。

## 【図2】

同グルコースセンサの要部の縦断面図である。

## 【図3】

本発明の一実施例および一比較例として作製したグルコースセンサの応答特性図である。

# 【符号の説明】

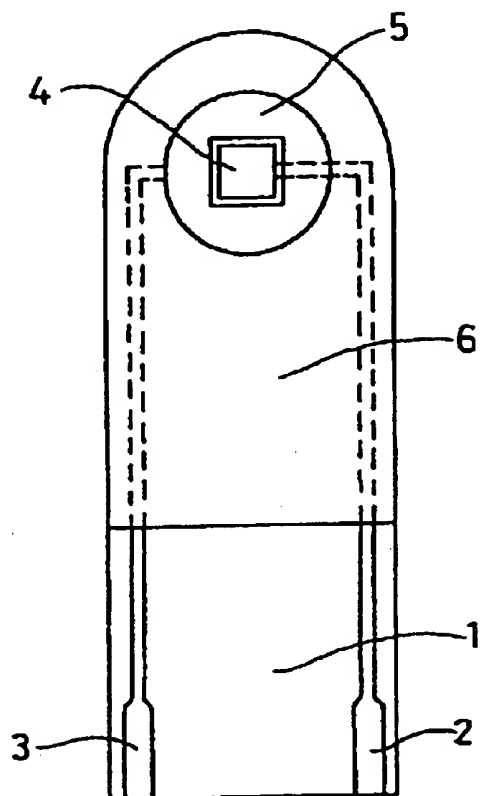
- 1 絶縁性の基板
- 2、3 リード
- 4 作用極

特平10-276153

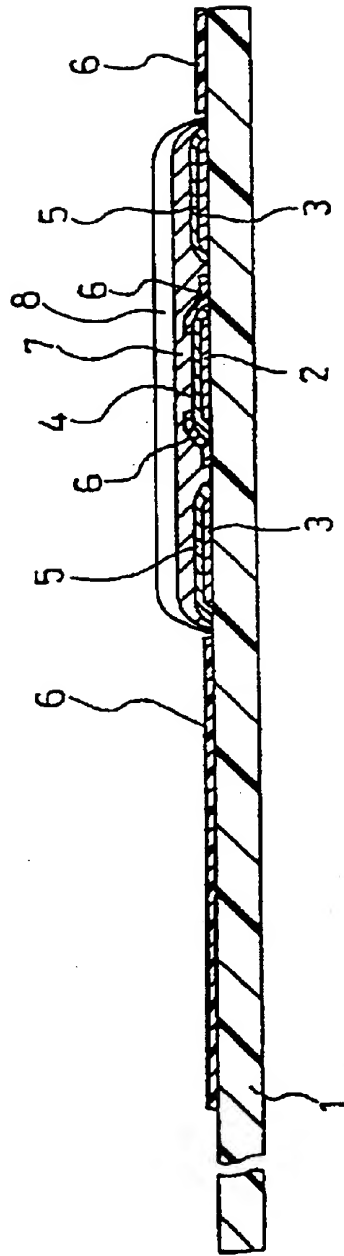
- 5 対極
- 6 絶縁層
- 7 CMC層
- 8 反応層

【書類名】図面

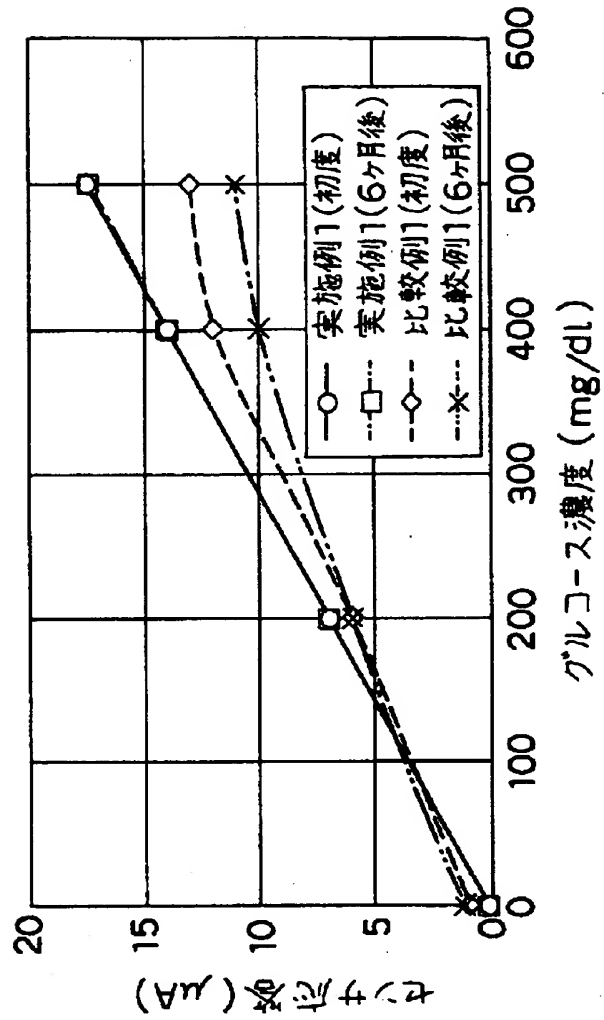
【図 1】



【図 2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 保存安定性が高く、ブランク値の小さい高性能なグルコースセンサを提供する。

【解決手段】 電気絶縁性の基板、前記基板上に形成された電極系、および前記電極系に接してまたはその近傍に形成された反応層を具備し、前記反応層が、ピロロキノリンキノンを経酵素としたグルコースデヒドロゲナーゼと、フタル酸、マレイン酸などの添加剤を含む。

【選択図】 なし



【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000005821

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1006 番地

【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100062926

【住所又は居所】 大阪府大阪市北区梅田 3 丁目 2 番 14 号 大弘ビル  
東島・石井特許事務所

【氏名又は名称】 東島 隆治

【選任した代理人】

【識別番号】 100072431

【住所又は居所】 大阪府大阪市北区梅田 3 丁目 2 番 14 号 大弘ビル  
東島・石井特許事務所

【氏名又は名称】 石井 和郎

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005821]

1. 変更年月日 1990年 8月28日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 大阪府門真市大字門真1006番地  
氏 名 松下電器産業株式会社